

	3	河	G	R.Rhine	up to 4.3ng/L		
17β-Oestradiol	8	表	Ne		nd(MID), 3ng/L	0.1-0.3ng/L	
	8	表	Ne		nd(MID), 5.5ng/L	0.3-0.6ng/L	
Oestrone	8	表	G		nd	0.5ng/L	
	8	表	Ne		0.3(MID), 3.4(MAX)	0.2-0.3ng/L	
	8	表	G		nd(MID), 1(90%), 1.6(MAX) ng/L	0.5ng/L	
	1	河	G		1ng/(med) 97.4ng/L(MAX)	1ng/L	6
<i>Ethinyl estradiol</i> (Ethinyl/oestradiol)	8	表	Ne		nd(MID), 4.3(MAX)ng/L	0.1-0.3ng/L	
	8	表	G		nd	0.5ng/L	
Etofibrate	3	表	G		nd		
	8	表	G		nd	30ng/L	
Fenofibrate	3	表	G		nd		
	8	表	G		nd-100ng/L	1ng/L	
Fenofibric acid	8	表	G		nd	10ng/L	
	3	表	B		0.28	0.05	32
	8	表	G		50ng/L	50ng/L	
	8	表	G		nd-172ng/L	5ng/L	
	8	表	G		45(MID), 170(90%), 280(MAX)ng/L	10ng/L	
Fenopropfen	3	表	B		nd	0.05	0
	8	表	G		nd	50ng/L	
	8	表	G		nd	-	
	8	表	G		nd	10ng/L	
Fenoterol	3	表	G		0.061		
	8	表	G		nd-8	3ng/L	
<i>Gemfibrozil</i>	8	表	G		nd(MID), nd(90%), 61(MAX)ng/L	10ng/L	
	3	表	B		0.51	0.05	31
	8	表	G		120ng/L	-	
	8	表	G		nd-190ng/L	5ng/L	
	8	表	G		5(MID), 250(MAX)ng/L	10ng/L	

	8	表	G	5 (MID), 190 (90%), 510 (MAX) ng/L	-	
Gentisic acid	3	表		1.2pg/L		MAX
	8	表	G	nd (MID), 110	75ng/L	
Hydroxyhippuric acid	3	表	G	nd		
	8	表	G	nd	75ng/L	
Ibuprofen	1	河	G	R.Rhine <0.2	0.05	33
	3	表	B	0.53		MAX
	8	表	G	140ng/L		
	8	表	G	nd-139ng/L	5ng/L	
	8	表	G	nd-280ng/L	5ng/L	
	8	表	G	70 (MID), 280 (90%), 530	10ng/L	
	8	表	B	190 (MAX) ng/L	10ng/L	
	12	河	B	nd	0.01	
Ifosfamide	3	表	G	nd		
	8	表	G	nd	10ng/L	
Indometacin (Indomethacine)	3	表		0.2	0.05	39
	8	表	G	50ng/L		
	8	表	G	nd-121ng/L	5ng/L	
	8	表	G	40 (MID), 170 (90%), 200 (MAX) ng/L	10ng/L	
Iomeprol	13	河	B	0.1 (MID), 0.47 (90%), 0.89 (MAX) μg/L	0.01	25
Iopamidol	13	河	B	0.49 (MID), 1.6 (90%), 2.8 (MAX) μg/L	0.01	25
Iopromide	13	河	B	01 (MID), 0.55 (90%), 0.91 (MAX) μg/L	0.01	25
Iothalamic acid	13	河	B	nd (MID), 0.1 (90%), 0.19 (MAX) μg/L	0.02	25
Ioxithalamic acid	13	河	B	nd (MID), 0.04 (90%), 0.08 (MAX) μg/L	0.03	25
Ketoprofen	3	表	G	0.12	0.05	30
						MAX

	8	表	G			nd		50ng/L	
	8	表	G			nd		-	
	8	表	G			nd (MID)	.120 (90%)	10ng/L	
	8	表	B			210ng/L		10ng/L	
Meclofenamic acid	3	表	G			nd			
Medazepam	3	表	G			+			
Menstranol	8	表	G			nd		10ng/L	
Mestranol	1	河	G			97	nd (Med.)	2ng/L (MAX)	1
Metaclofenamic	8	表	G			nd		10ng/L	
Methicillin	1	河	G	R.Rhine		nd			
	8	表	G			nd		20ng/L	
Methotrexate	8	表	UK			nd		6.25ng/L	
N-methylphenacetin	8	表	G			+			
Metoprolol	3	表	G			2.2			MAX
	8	表	G			nd-1540ng/L		3ng/L	
	8	表	G			45 (MID)	.1200	10ng/L	
Musk ambrette	3	fresh water 100,101				+			
Musk ketone	3	fresh water 100,101				+			
Musk moskene	3								
Musk tibetene	3								
Musk xylene	3	fresh water 100,101				+			
2-Amino musk ketone	3								
2-Amino musk xylene	3								
4-Amino musk xylene	3								

Nadolol	3	表	G	nd		
	8	表	G	nd-9ng/L	5ng/L	
	8	表	G	nd	10ng/L	
Nafcillin	1	河	G	nd		
	8	表	G	nd	20ng/L	
Naproxen	1	河	G	R.Rhine	<不明	
	3	表	B	0.39		MAX
	8	表	G	70(MID),150(90%),390	10ng/L	
	8	表	B	20(MID),210(MAX)	10ng/L	
	12	河	B	nd-0.05	0.01	
Norethisterone	8	表	UK	nd-17ng/L	10ng/L	
	8	表	UK	nd-10ng/L	2ng/L	
Oxacillin	1	河	G	nd		
	8	表	G	nd	20ng/L	
Oxytetracycline	1	河	G	nd		
	8	表	G	nd	50ng/L	
Penicillin-G,	8	表	G	nd	20ng/L	
	1	河	G	nd		
Phenoxymethylpenicillin (penicillin V)	8	表	G	nd		
	8	表	G	nd	20ng/L	
Pentachlorophenol	3	表	G	0.95		MAX
	8	表	G	+	not	
Progesterone	8	表	G	24(MID),150(90%),950	20ng/L	
	8	表	UK	nd-6ng/L	5ng/L	
Propanolol	3	表	G	0.59		MAX
	8	表	G	nd-98ng/L	3nd/L	
Propylphenazone	8	表	G	12(MID),440(90%),590	5ng/L	
	8	表	G	nd-350	5ng/L	
Roxithromycin	1	河	G	up to 1.7		
	1	河	G	Urselbach	97.057	
	1	河	G	Erlenbach	97.022	

1	河	G	Nidda	97:0.2		
1	河	G	Main	97:0.11		
1	河	G	Fulda(Wah n.)	0.1 97		
1	河	G	Rhine	97:nd		
8	表	G		nd(MID),200(90%),560 (MAX)ng/L	20ng/L	
3	表	G		0.035		MAX
8	表	G		nd		
8	表	G		nd(MID),nd(90%),35	10ng/L	
3	表	G		4.1		MAX
8	表	G		25(MID)130(90%),4100	10ng/L	
1	河	G		up to 0.5		
8	表	G		nd	20ng/L	
1	河	G		up to 0.5		
1	河	G	Urselbach	97:nd		
1	河	G	Erlenbach	97:0.12		
1	河	G	Nidda	97:0.17		
1	河	G	Main	97:0.6		
1	河	G	Fulda(Wah n.)	0.6 97		
1	河	G	Rhine	97:0.6		
8	表	UK		~1000ng/L	-	
8	表	G		30(MID),140(90%),480	20ng/L	
3	表	G		nd		
8	表	G		nd-9	3ng/L	
8	表	G		nd	10ng/L	
1	河	G		nd		
8	表	UK		~1000ng/L	-	
8	表	G		nd	50ng/L	
8	表	G		nd(MID),nd(90%),10	10ng/L	
8	表	UK		~1000ng/L	-	
Salbutamol						
Salicylic acid						
Sulfadimidin						
Sulfamethazine						
Sulfamethoxazole (Sulphamethoxazol e)						
Terbutaline						
Tetracycline						
Theophylline (Theophylline)						

Timolol	3	表	G	0.01		MAX
Tolfenamic acid (AHTN)	8	表	G	nd-10ng/L	3ng/L	
	3	表	G	nd		
	8	表	G	nd	10ng/L	
Trimethoprim	1	河	G	up to 0.5		
	1	河	G	Urselbach	0.2	
				97		
	1	河	G	Erlenbach	0.08	
				97		
	1	河	G	Nidda	97	0.1
	1	河	G	Main	97	nd
	1	河	G	Fulda(Wahn.)	nd	
				97		
	1	河	G	Rhine	97	nd
8	表	G	nd(MID),90(90%),200	20ng/L		

添付資料3 「環境中に検出される生理活性物質についての調査のまとめ」地下水、飲料水のデータ

文献

1. Wilken R.D. & Ternes T.A., Pharmaceuticals, Endocrine Disruptors and Personal Care Products in the Environment: Agents of subtle Change?, ESWE Institute
2. Graumann K., Breithofer A. and Jungbauer A. (1999) Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds? The Science of the Total Environment, 225,69-79
3. Daughton C.G. & Ternes T.A. (1999) Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of subtle Change?, Env. Health Perspectives, 107,907-9443
8. Ayscough N.J., Fawell J., Franklin G. & Young W., Review of Human Pharmaceuticals in the Environment, R & D Technical Report P390
10. Ternes T.A., Stumpf M. Mueller J., Haberer K., Willken R.D. & Servos M. (1999) Behavior and Occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigation in Germany, Canada and Brazil, The Science of the Total Environment, 225,81-90
13. Ternes T.A. & Hirsch R. (2000) Occurrence and Behavior of x-ray Contract Media in Sewage facilities and the Aquatic Environment, Environ. Sci. Technol. 34, 2741-2748

No.	Compound	References	Sampling			Concentration detected (μ g/l)	LODorLOQ (μ g/l)	sampling数											
			分類	国	場所				年										
1	Bezafibrate	1	地	G	G	groundw.1 ~ 0.100 0.010 < groundw.2 < 0.100 max 0.027, median < LOD	0.025*1	30											
									8	飲	G	0.027	-						
															1	地	G	0.010 < groundw.1 < 0.100	
5	Carbamazepine	1	飲	G	max 0.030, median < LOD		12												
								1	地	G	nd								
7	Chloramphenicol	8	地	G	nd	0.020*2													
								1	地	G	nd								
8	Chlortetracycline	8	地	G	nd	0.050*2													
								1	地	G	nd								
9	Clarithromycin	8	地	G	nd	0.020*2													
								1	地	G	nd								

10	Clofibric acid	1	地	G				0.100 < groundw.1 0.010 < groundw.2 < 0.100					
		3	飲水	G				0.270				0.001*1	30
		8	地	G	A	1997		0.070-7.300					17
				G	A	1997		4.000					17
			飲	G		1996		0.001, 0.070 (MAX)					
				G		1994		0.010-0.165					
				G		1997		0.270					
													14 (13 waterworks < 0.075 μg/l)
11	Clofibric acid derivative	8	地	G	B	1996		nd-0.170				0.001*2	
12	Cloxacillin	1	地	G				(+)					
13	Diatrizoate	8	地	G	A	1997		~0.050-2.900					17
14	Diatrizoate(Na)	1	地	G				nd				0.020*1	
		1	地	G				nd				0.020*2	
15	Diazepam	3	地	US	D			0.010-0.040					
		8	飲	UK		1981		0.010					
		1	地	G				~1.000 groundw.1 ~0.00 groundw.2					
16	Diclofenac	1	飲	G				0.006max. < LOD median				0.001*1	30
		1,2	水	G									
		8	地	G	A	1997		nd-0.380					17
		8	飲	G		1996		0.002-0.006					
17	Dicloxacillin	1	地	G				nd					
		8	地	G		1999		nd				0.020*2	
18	Doxycycline	1	地	G				nd					
		8	地	G		1999		nd				0.050*2	
19	Erythromycin	1	地	G				nd					
		8	地	G		1999		nd				0.020*2	
20	17β-Oestradiol	8	飲	UK		1997		nd				0.0002*2	6
21	Oestrone	8	飲	UK		1997		nd				0.0002*2	6

22	Ethinylloestradiol	1 8 8	飲 飲 飲	G G UK		1977 1985 1989	0.00083-0.0064 nd nd-0.004	- 0.005*2 0.001*2	
		8	飲	UK		1997	nd	0.0004*2	6
23	Fenofibrate	8	飲	NE			nd-0.045		17
24	Fenofibric acid	1 1	地 飲	G G	A	1997	max0.042, median<LOD 0.010<groundw.1	0.005*1	30
		1	地	G			groundw.2<0.010		
25	Ibuprofen	1 1,2 8 8	飲 水 地 飲	G G G G			max0.003, median<LOD nd-0.200	0.001*1	30
		13	地	G			0.001<groundw.1		17
26	Indometacin	1	地	G		1997	nd-0.200		
27	Iomeprol	1	地	G	A	1996	0.001,0.003 (Max)		
28	Iopamidol	1	地	G			0.001<groundw.1		
29	Iopromide	1	飲	G			max0.079, median<LOD	0.010*1	10
		1	地	G			max0.086, median<LOD	0.010*1	10
30	Iothalamic acid	1 13	地 地	G G					
31	Ioxithalamic acid	1	地	G					
32	Meprobamate	8	地	US	C	1993	(+)		
33	Methicillin	1 8	地 地	G G			nd	0.050*2	
34	Metorexate	8	飲	UK		1999 1985	nd nd	0.00625*2	
35	N-methylphenacetin	8	地	G	A	1997	~nd-0.470	0.005*2	17
36	Metoprolol	1	地	G			0.010<groundw.1		
37	Nafcillin	1 8	地 地	G G			nd nd		
		8	地	G		1999	nd	0.020*2	
38	Norethisterone	8	飲	UK		1985	nd	0.010*2	
		1	地	UK		1989	nd	0.002*2	
39	Oxacillin	1 8	地 地	G G			nd nd		
		8	地	G		1999	nd	0.050*2	

40	Oxytetracycline	1	地	G				nd		
41	Penicillin-G	8	地	G				nd	0.050*2	
42	Penicillin-V	1	地	G						
43	Phentobarbital	8	地	G		1999		nd	0.020*2	
44	Phenazone	1	地	G				nd		
45	Phensuximide	8	地	G		1999		nd	0.020*2	
46	Primidon	8	地	US	C	1993		(+)	—	
47	Progesterone	1	飲	G				max0.050, median<LOD	0.010*1	12
48	Propranolol	8	地	G	A	1997		nd-1.250	0.010*2	17
49	Propylphenazone	8	地	US	C	1993		(+)	—	
50	Roxithromycin	1	飲	G						
51	Sulfadimidin	8	飲	UK		1985		nd-0.006	0.005*2	
52	Sulfametazine	1	地	G				0.010<groundw.1		
53	Sulfamethoxazole	8	地	G	A	1997		nd-1.465	—	17
54	Tetracycline	1	地	G				nd	0.02*1	
55	Trimethoprim	8	地	G		1999		nd	0.020*2	

Notes

水 : tap water

飲 : drinking water

地 : ground water

*1 : LOQ

*1 : LOD

A : groundwater wells in the catchment of a drinking water treatment plant

B : maximum (0.170 μg/l)-Berlin, the waterwork recharged groundwater contaminated by sewage

C : Florida, a groundwater well concluded to be a nearby landfill(300m)recived wastes from a naval hospital during 1968-1991

D : New Jersey, from a Superfund site near Atlantic City

(+) : positive identification

添付資料4 「環境中に検出される生理活性物質についての調査のまとめ」 3 医薬品生産数量表」

PEC: Predicted Environmental Concentration
 PNEC: Predicted No-Effects Concentration

使用量(トン/年) × 10¹²

PEC(μg/L)=

365 × 人口 × 一日一人当たりの排水量(L)

品名	薬効	t/年 (1994-98年 [使用量平均])	PEC	PNEC (Webbより)	PEC/PNEC (Webb)	PNEC (吉岡より)	PEC/PNEC (吉岡)
Acetaminophen	解熱鎮痛消炎剤	22.06532	1.26	9.2	0.14	0.092	
Allopurinol	通風治療剤	47.9444	2.74				
Amitriptyline	抗うつ薬	1.76875	0.10	0.78	0.13	0.0016	63.12
Amoxicillin	抗生物質	40.61819	2.32				
Ampicillin	抗生物質	6.45005	0.37			0.13	2.83
Aspirin	解熱鎮痛消炎剤	16.76396	0.96	141	0.01	13	0.07
Bethamethasone	副腎ホルモン剤	0.0236146	0.00				
Caffeine	強心剤	2.7628	0.16			0.000005	31551
Carbamazepine	抗てんかん剤	39.90352	2.28				
Chlorhexidine (chlorhexidine gluconate)	外用用殺菌消毒剤	197.79202	11.29392434				
Chlorpromazine	精神神経用剤	5.719982	0.33				
Clofibrate	高脂血症用剤	14.92855	0.85	12	0.07		
Diazepam	抗うつ薬	2.1444136	0.12	4.3	0.03	0.14	0.87
Diclofenac-Na	解熱鎮痛消炎剤	19.36633	1.11				
Dicloxacillin (ampicillin・dicloxacillin sodium)	抗生物質	0.18175	0.010377925				
Digitoxin	強心剤	0.0007429	0.00				
Digoxin	強心剤	0.0278247	0.00	24	0.00	10	0.00
Doxycycline	抗生物質	2.1699112	0.12				
Ephedrine	鎮咳剤	2.285328	0.13				
Erythromycin	抗生物質	6.58602	0.38	74	0.01	0.0003	1254

Erythromycin ethylsuccinate	抗生物質	11.89418	0.68						
Ibuprofen	解熱鎮痛消炎剤	137.15128	7.83						
Isoniazid	抗結核剤	8.88828	0.51	24.4	0.02	0.24			2.11
Ketoprofen	解熱鎮痛消炎剤	9.763375	0.56						
Methyl Ephedrine	鎮咳剤	2.072488	0.12						
Methyldopa	血圧降下剤	23.87285	1.36						
Metronidazole	抗トリコモナス剤	1.1418	0.07	12.5		1.3			0.05
Naproxen	解熱鎮痛消炎剤	5.11258	0.29	128	0.00				
Nifedipine	血管拡張剤	6.925458	0.40						
Nitrazepam	抗うつ薬	1.115023	0.06						
Oxytetracycline	抗生物質	0.248	0.01	0.23	0.06	0.0011			12.87
Phenytoln	抗てんかん剤	4.662	0.27			0.009			29.58
Piroxicam	解熱鎮痛消炎剤	0.59698	0.03						
Propranolol	交感神経抑制薬	34.149174	1.95	1.87	1.04	0.0034			573.51
Quinine	抗原虫剤	0.06306	0.00	10.1	0.00				
Spironolactone	利尿剤	6.555235	0.37						
Tetraacycline	抗生物質	2.74015	0.16	16	0.01	0.17			0.92
Theophylline (Theophylline)	気管支拡張剤	98.0635	5.60	155	0.04	0.86			32.94
Tolfenamic acid (AHTN)	糖尿病用剤	13.303813	0.76						
Triamcinolone	糖質副腎皮質ホルモン	0.014018	0.00						
Triamterene	利尿剤	0.302964	0.02						
Trimethoprim									
(sulfamethoxazole · trimethoprim)	合成抗菌剤								

モノブチルフタルレートのラット雄胎児における性分化に及ぼす影響に関する研究

研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

研究要旨

可塑剤として使われている dibutyl phthalate (DBP) の主要な代謝物である monobutyl phthalate (MBuP) をラットの妊娠後期に投与して雄児の性分化に及ぼす影響について調べ、DBP の雄児の生殖器形成に対する作用における MBuP の役割について検討した。250, 500 または 750 mg/kg の MBuP をラットの妊娠 15-17 日に強制経口投与し、妊娠 21 日に妊娠ラットを開腹して胎児への影響を調べた。500 mg/kg 以上で母体体重増加抑制、750 mg/kg で飼料摂取量の低下がみられた。500 mg/kg 以上で着床後胚死亡率上昇、750 mg/kg で雌雄の胎児体重の低下が観察された。雄胎児では、250 mg/kg 以上で精巣下降不全の頻度が上昇し、肛門-生殖器突起間距離 (AGD) 及び AGD の体重補正值 (AGD/body weight, AGD/cube root of body weight) の短縮が認められた。雌胎児においては、AGD 及び AGD の体重補正值の短縮は認められなかった。これらの結果から、妊娠 15-17 日に投与した MBuP は雄胎児における性分化に悪影響を及ぼし、MBuP は DBP による抗アンドロゲン作用の活性化代謝物であることが示唆された。

A. 研究目的

フタル酸エステル類 (PAEs) は可塑剤として広く使われており、PAEs は地球規模の環境汚染物質であり (1-4)、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の一つとしても知られている。最近、DBP は butyl benzyl phthalate (BBP) などとともにヒト乳癌細胞 (5-8) や組み替え酵母 (8, 9) を用いた *in vitro* の実験において弱いエストロゲン様作用を示すことが報告されており、生体に対する作用が注目されている。発生過程にある胎児や新生児は化学物質の有害な影響を受けやすく、生殖、発生に対するこれらの化学物質の影響は世代を越えて深刻な影響を及ぼす可能性があることから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの必要性が益々高まっている。PAEs の一つである dibutyl phthalate は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤などに汎用されており、また、各種化粧品にも使われている (10)。DBP はラット (11-23) 及びマウス (24, 25) において発生毒性を示すことが知られている。我々は先に、ラットの妊娠初期または妊娠中期に DBP を投与したときに胚致死作用及び催奇形作用を示すことを明らかにした (14-16)。Mylchreest ら (21, 23) はラットの妊娠後半及び授乳中に 250 mg/kg 以上の DBP、または妊娠 12-21 日に 100 mg/kg 以上の DBP を投与したときに次世代雄の生殖器系の発生に影響を及ぼすことを報告した。我々もまた 1% の DBP を含む飼料をラットの妊娠 11-21 日に与えたとき雄胎児における肛門-生殖器突起間距離 (AGD: Anogenital distance) が有意に短縮し、精巣下降不全を有する胎児の発現頻度が有意に上昇することを明らかにし (18)、更に、これらの抗アンドロゲン作用は DBP をラットの妊娠 15-17 日に投与したときに最も強く発現することから、DBP の抗アンドロゲン作用発現の感受期は妊娠 15-17 日であることを示した (22)。

Monobutyl phthalate (MBuP) は DBP をラットに投与したときに主要な代謝物として生成されることが知られている (26-28)。本研究においては、DBP の生殖発生毒性における MBuP の役割について検討するために、

ラットの妊娠後期、DBP の抗アンドロゲン作用発現の感受期に MBuP を投与して雄胎児の性分化に与える影響を調べた。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。雌ラットを雄と一夜同居させ、翌朝膣垢内に精子を認めた雌ラットを妊娠とし、この日を妊娠0日として以後個別ケージにて飼育した。

妊娠15-17日に250, 500または750 mg/kgのMBuPをアンモニウム水溶液として投与日の体重に基づいて5 ml/kg強制的経口投与した。

妊娠ラットは妊娠21日に過剰のエーテル麻酔下にて開腹し、着床数、吸収胚数、生存及び死亡胎児数を記録した。生存胎児については、体重を測定し、AGDをノギスで測定した。生存胎児はブアン液で固定後、生殖腺によって雌雄を半別した。雄胎児については精巣下降不全の有無を調べた。胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

ラットの妊娠15-17日にMBuPを投与したときの妊娠ラットの所見をTable 1に示した。最高投与量では妊娠ラットに立毛がみられたが、いずれの群にも死亡例は観察されなかった。妊娠15-18日の母体体重増加は500及び750 mg/kg投与群で有意に低く、妊娠18-21日の母体体重増加は750 mg/kg投与群で有意に低かった。妊娠15-18日の摂餌量は750 mg/kg投与群で有意に低かった。

生殖及び胎児の所見をTable 2に示した。黄体数、着床数及び生存胎児の性比にはMBuP投与群と対照群との間の有意差は認められなかった。吸収胚数及び着床後胚死亡率は500及び750 mg/kgで有意に高かった。生存胎児数は500及び750 mg/kgで有意に低かった。750 mg/kg投与群における雌雄の生存胎児体重は対照群に比べて有意に低かった。精巣下降不全を有する胎児の出現頻度は250, 500及び750 mg/kg投与群で有意に上昇した。精巣下降不全は、250 mg/kg投与群で110胎児中9胎児(16母体中6母体)、500 mg/kg投与群で71胎児中61胎児(全母体)、750 mg/kg投与群で54胎児中53胎児(全母体)に観察された。

雌雄の胎児のAGDをFig. 1に示した。250, 500及び750 mg/kg投与群における雄胎児のAGDは対照群に比べて有意に短く、500及び750 mg/kg投与群では雌様に短縮していた。雌胎児におけるAGDにはMBuP投与の影響は認められず、MBuP投与群と対照群との間の差はみられなかった。

AGDの体重による補正值(AGD/体重及びAGD/体重の立方根)をFig. 2に示した。250, 500及び750 mg/kg投与群における雄胎児のAGD補正值は対照群に比べて有意に低かった。MBuP投与群における雌胎児のAGD補正值には対照群との間の差は認められなかった。

D. 考察

我々は前報において、ラットの妊娠後半に飼料中濃度1.0%以上のDBPを与えたときにAGDの短縮及び精巣下降不全の頻度の上昇が認められ、妊娠後半のラットに投与したDBPは雄胎児の性分化に影響を及ぼすことを明らかにした(18)。更に、これらの影響の感受期を調べるために、妊娠後半の3日間にDBPを投与したとき

の影響を調べた結果、妊娠12-14日及び妊娠18-20日における投与では雄胎児のAGDの短縮はわずかであり、体重による補正値の有意の低下は認められなかったが、妊娠15-17日の投与では雄胎児のAGDの短縮は著しく、体重による補正値も有意に低下することを報告した。また、妊娠15-17日のDBP 500 mg/kg以上の投与により高頻度で精巣下降不全が観察され、DBPによる生殖器異常の sensitive window は妊娠15-17日であることを示した(22)。

本実験では、DBPの主要な代謝物であるMBuPの雄ラット胎児のメス化作用についてMBuPをDBPによる生殖器異常の sensitive window に投与して検討した。今回の実験では、妊娠15-17日のMBuP投与により、雄外部生殖器の発生指標であるAGDの短縮及び精巣下降不全が惹起され、MBuPはDBPによる抗アンドロゲン作用の原因物質であることが示唆された。

MBuPの母体毒性は500 mg/kg以上の投与量で発現し、胚致死作用も500 mg/kg以上の投与量で発現した。胎児の成長に対する悪影響は750 mg/kgで観察された。これらの結果は、250 mg/kgのMBuPは母体及び胎児の生存・成長に影響を及ぼさないことを示している。

AGDは身体の大きさによって変化することが知られており、AGDの補正値として体重の立方根で割った値を用いることが推奨されている(29)。本実験においては、雄胎児のAGD補正値(AGD/body weight及びAGD/cube root of body weight)はともにすべてのMBuP投与群で有意の低下が認められた。しかし、雌胎児ではAGDの補正値にもMBuP投与による影響はみられなかった。これらの所見は250 mg/kg以上のMBuPをラットの妊娠15-17日に投与したとき雄胎児のAGDに影響を及ぼすことを示している。更に、250 mg/kg以上のMBuPをラットの妊娠15-17日に投与したときに精巣下降不全の発現頻度も上昇することが明らかになった。我々は先に、ラットの妊娠7-15日に500 mg/kg以上のMBuPを投与すると、着床後胚死亡及び奇形胎児の発現頻度が上昇することを報告した(30)。このように、AGD短縮及び精巣下降不全は母体毒性、胎児体重増加抑制、着床後胚死亡、胎児奇形を発現させるよりも低い投与量で発現することが明らかになり、雄の生殖器系は他の器官よりもMBuPの毒性に感受性が高いことが示唆された。この現象はDBPでも観察されている(18, 19)。

性分化中のアンドロゲン作用の全体的な過程はほ乳類動物において少なからぬ相同性があることをGrayら(31)は述べている。アンドロゲン(テストステロン及びジヒドロテストステロン)は雄表現型の決定要因であり(32)、出生前の精巣下降はテストステロンにより制御される(33)。Imajimaら(34)は、ラット当たり300 mg (1000-1071 mg/kg)を妊娠14-17日に経口投与したときに精巣下降不全が惹起されることを報告している。外部生殖器の男性化はテストステロンの代謝物であるジヒドロテストステロンに依存した現象である(35, 36)。これらの現象が妊娠15-17日のMBuP投与により影響を受けたことを本実験成績が示している。本実験において、250 mg/kg以上のMBuPを経口投与することにより、テストステロン及びジヒドロテストステロンに依存した両現象が影響を受けることを明らかにした。MBuPは酵母を用いた試験ではエストロゲン様作用を示さず(8)、transcriptional activation assayでアンドロゲンレセプターとも競合的結合を示さない(37)ことが報告されている。これらの所見はMBuPは抗アンドロゲン作用を有することを示しており、in vivoで観察される作用はアンドロゲンレセプターを介した作用ではないらしいことを示唆している。

我々は先に、妊娠中期にMBuPを投与するとDBPを投与したときと同様の奇形の型及び奇形発現の時期特異性を示すことから、DBPの催奇形性はMBuPを介して発現することを示唆した(38)。我々のこの仮説は、ラ

ットの妊娠14日にDBPを経口投与したとき、母体及び胎児中の未変化のDBPはわずかに検出されなかったが、MBuPは相当量検出されたとするSaillenfaitら(20)の報告によって支持されている。MBuPは精巣毒性及(39-41)ひ精巣下降不全(34)を惹起する活性代謝物であることが報告されており、本実験によりMBuPは抗アンドロゲン作用の活性代謝物であることが示唆された。

E. 結論

250, 500 または 750 mg/kg の MBuP をラットの妊娠 15-17 日に強制経口投与し、児の性分化に及ぼす影響について検討した。500 mg/kg 以上で母体体重増加抑制、750 mg/kg で飼料摂取量の低下がみられた。500 mg/kg 以上で着床後胎死亡率上昇、750 mg/kg で雌雄の胎児体重の低下が観察された。雄胎児においては、250 mg/kg 以上で精巣下降不全の頻度が上昇し、AGD 及び AGD の体重補正值の短縮が認められた。雌胎児においては、AGD 及び AGD の体重補正值の短縮は認められなかった。これらの結果から、妊娠 15-17 日に投与した MBuP は雄胎児における性分化に悪影響を及ぼし、MBuP は DBP による抗アンドロゲン作用の活性代謝物であることが示唆された。

引用文献

- [1] Autian J. Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature. *Environ Health Perspect.* 1973; 4: 3-26.
- [2] Marx JL. Phthalic acid esters: biological impact uncertain. *Science.* 1972; 178: 46-7.
- [3] Mayer FL Jr, Stalling DL, Johnson JL. Phthalate esters as environmental contaminants. *Nature.* 1972; 238: 411-3.
- [4] Jaeger RJ, Rubin RJ. Plasticizer from plastic devices: extraction, metabolism, and accumulation by biological systems. *Science.* 1970; 170: 460-2.
- [5] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 1995; 103: 582-7.
- [6] Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem.* 1995; 41: 1888-95.
- [7] Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano F. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 1995; Suppl. 7: 113-22.
- [8] Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 802-11.
- Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: 734-42.
- [10] International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 189. Di-n-butyl phthalate. World Health Organization, Geneva, 1997.

- [11] Singh AR, Lawrence WH, Autian J. Teratogenicity of phthalate esters in rats. *J Pharm Sci.* 1972; 61: 51-5.
- [12] Nikonorow M, Mazur H, Piekacz H. Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1973; 26: 253-9.
- [13] Peters JW, Cook RM. Effect of phthalate esters on reproduction in rats. *Environ Health Perspect.* 1973; 3: 91-4.
- [14] Ema M, Amano H, Itami T, Kawasaki H. Teratogenic evaluation of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicol Lett.* 1993; 69: 197-203.
- [15] Ema M, Amano H, Ogawa Y. Characterization of the developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicology.* 1994; 86: 163-74.
- [16] Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y. Developmental effects of di-*n*-butyl phthalate after a single administration in rats. *J Appl Toxicol.* 1997; 17: 223-9.
- [17] Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE. Reproductive toxicity of di-*n*-butyl phthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: 102-7.
- [18] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Further evaluation of developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol Lett.* 1998; 98: 87-93.
- [19] Mylchreest E, Cattley RC, Foster PMD. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci.* 1998; 43: 47-60.
- [20] Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JP. Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-*n*-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol Sci.* 1998; 45: 212-24.
- Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PMD. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 156: 81-95.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol Lett.* 2000; 111: 271-8.
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(*n*-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci.* 2000; 55: 143-51.
- [24] Shiota K, Chou MJ, Nishimura H. Embryotoxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ Res.* 1980; 22: 245-53.
- Lamb JC IV, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987; 88: 255-69.

Albro PW, Moore B. Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. *J Chromatogr.* 1974; 94: 209-18.

[27] Williams DT, Blanchfield BJ. The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-¹⁴C in the rat. *J Agric Food Chem.* 1975; 23: 854-8.

[28] Tanaka A, Matsumoto A, Yamaha T. Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology.* 1978; 9: 109-23.

[29] Gallavan RH Jr, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol.* 1999; 13: 383-90.

[30] Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. Developmental toxicity evaluation of mono-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicol Lett.* 1995; 101-6.

[31] Gray LE Jr, Ostby JS, Kelce WR. Developmental effects of an environmental androgen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994; 129: 46-52.

[32] Jost, A., Vigier, B., Prepin, J., Perchellet, J.P., 1973. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res.* 29, 1-41.

[33] Spencer JR, Torrado T, Sanchez RS, Vaughan ED Jr, Imperato-McGinley J. (1991) Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology.* 1991; 129: 741-8.

[34] Imajima T, Shono T, Zakaria O, Suita S. Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *J. Pediatr. Surg.* 1977; 32: 18-21.

[35] Imperato-McGinley J, Binienda Z, Arthur A, Mininberg DT, Vaughan ED Jr, Quimby FW. The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme 5 α -reductase. *Endocrinology.* 1985; 116: 807-12.

[36] Clark RL, Antonello JM, Grossman SJ, Wise LD, Anderson C, Bagdon WJ, Prahalada S, MacDonald JS, Robertson RT. External genitalia abnormalities in male rats exposed in utero to finasteride, a 5 α -reductase inhibitor. *Teratology.* 1990; 42: 91-100.

[37] Gray LE Jr, Ostby JS, Mylchreest E, Foster PMD, Kelce WR. Dibutyl phthalate (DBP) induces antiandrogenic but not estrogenic in vivo effects in LE hooded rats. *Toxicol Sci.* 1998; 42 (1-S): 176.

[38] Ema M, Kurosaka R, Harazono A, Amano H, Ogawa Y. Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-*n*-butyl phthalate in rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1996; 31: 170-6.

[39] Cater BR, Cook MW, Gangolli SD, Grasso P. Studies on dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat: effect on zinc metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1977; 41: 609-18.

[40] Gangolli SD. Testicular effects of phthalate esters. *Environ Health Perspect.* 1982; 45: 77-84.

[41] Mikuriya H, Ikemoto I, Tanaka A. Urinary metabolites contributing to testicular damage induced by butylbenzyl phthalate. *Jikeikai Med J.* 1988; 35: 403-9.

F. 研究発表

1. 論文発表

Ema, M. and Miyawaki, E. Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats *Reprod. Toxicol.*, in press.

Harazono, A. and Ema, M. (2001) Effects of 4-tert octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats *Toxicol. Lett.*, 119, 79-84.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 15, 189-194.

Ema, M. and Harazono, A. (2000) Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats *Cong. Anom.*, 40, S108-S120.

Harazono, A. and Ema, M. (2000) Suppression of decidual cell response induced by tributyltin chloride in pseudopregnant rats: As a cause of early embryonic loss. *Arch. Toxicol.*, 74, 632-637.

Ema, M. and Harazono, A. (2000) Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 14, 451-456.

小泉睦子、江馬 眞、広瀬明雄、長谷川隆一(2000)フタル酸エステル of 生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究: 主として Di (2-ethylhexyl) phthalate および Di-n-butyl phthalate について、*食品化学学会誌*, 7, 65-71.

Ema, M. (2000) Reproductive and developmental toxicity of triphenyltin chloride in rats *Cong. Anom.*, 40, 8-13.

2. 学会発表

Ema, M. and Miyawaki, E. Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBP) during pregnancy 40th Annual Meeting, Society of Toxicology

江馬 眞、ビスフェノール A のラットにおける2世代繁殖試験、第3回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム

関沢 純、江馬 眞、環境ホルモン物質としてのリスク評価の検討、第3回内分泌攪乱化学物質学会

Ema, M. Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. 6th Scientific Meeting of the International Federation of Teratology Society, Satellite Meeting.

江馬 眞、宮脇英美子, ジブチルフタレートのラットにおける雄胎児の性分化に及ぼす影響 第
40 回日本先天異常学会

江馬 眞、原園 景, ラットの妊娠初期に投与した dibutyltin dichloride の胚致死作用 第
27 回日本トキシコロジー学会

G. 知的所有権の取得状況

特許

なし

実用新案登録

なし

その他

なし